

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER
FACULTÉ DES SCIENCES

RECHERCHES SUR LA CARNITINE

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier

pour obtenir le grade de

Docteur-Ingénieur

par

Alain CERVONI

Ingénieur Chimiste (E.N.S.C.M.)

Licencié ès Sciences

soutenue le Mars 1969 devant la Commission d'examen

JURY :

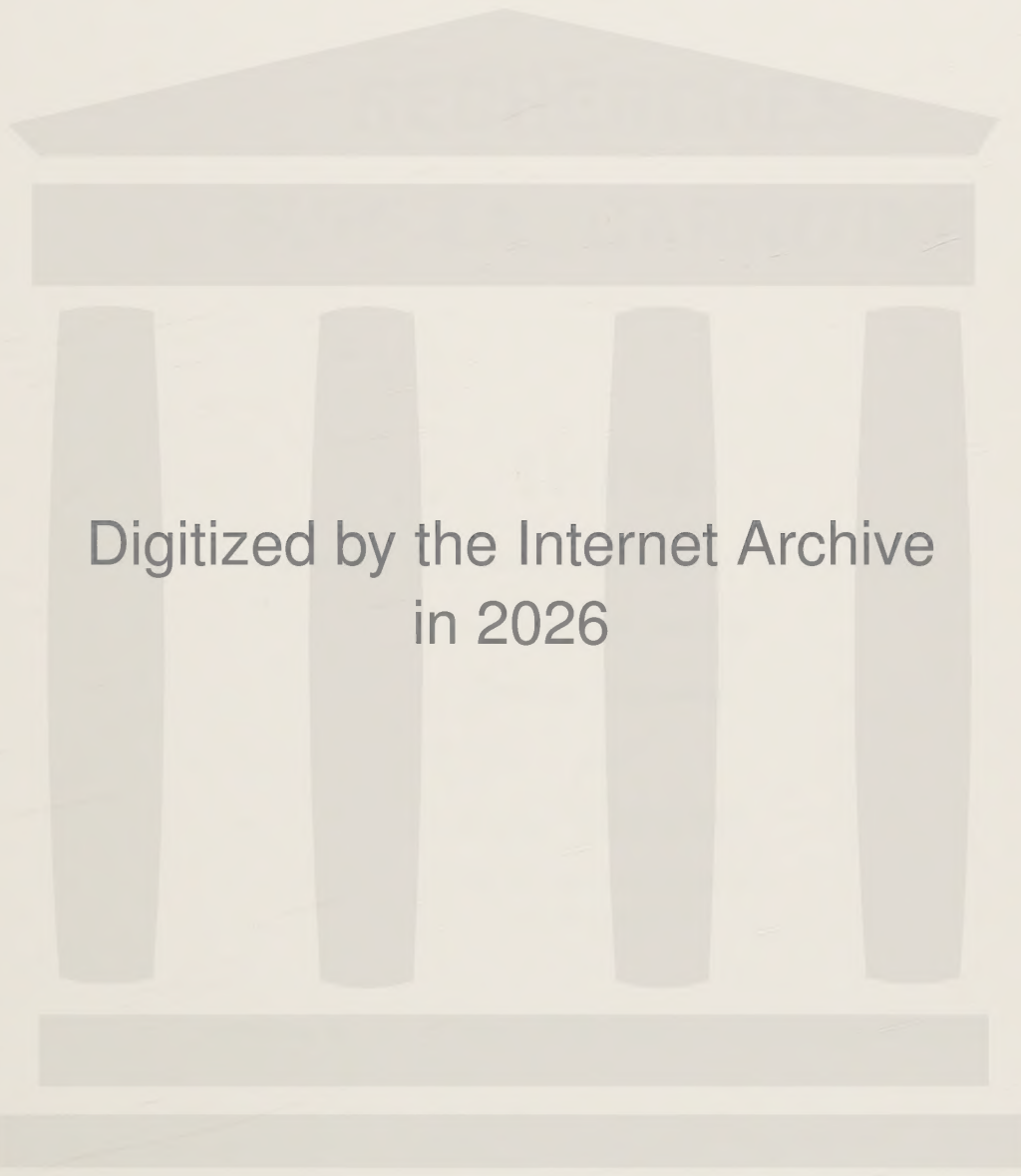
M. E. KAHANE

Président

M^{me} H. COLSON-GUASTALLA

M. J. MORETTI

} *Assesseurs*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551917_0005

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DES SCIENCES

RECHERCHES SUR LA CARNITINE

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences de Montpellier

pour obtenir le grade de

Docteur-Ingénieur

par

Alain CERVONI

Ingénieur Chimiste (E.N.S.C.M.)

Licencié ès Sciences

soutenue le

Mars 1969 devant la Commission d'examen

JURY :

M. E. KAHANE

Président

M^{me} H. COLSON-GUASTALLA

M. J. MORETTI

} *Assesseurs*



FACULTÉ DES SCIENCES DE MONTPELLIER

LISTE DES PROFESSEURS

DOYEN A. CASADEVALL

DÉLÉGUÉ AU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ

Premier Assesseur Ch. SAUVAGE

DÉLÉGUÉ AU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ

Deuxième Assesseur P. DUMONTET

DIRECTEUR DU COLLÈGE SCIENTIFIQUE UNIVERSITAIRE
DE PERPIGNAN

J. RABINOVITCH

DIRECTEUR DE L'I.P.E.S. M. MAURIN

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS E. SIAU

DOYEN HONORAIRE P. MATHIAS

PROFESSEURS HONORAIRES : R. JACQUES J. SOULA
M. CASTERAS G. DENISOT
E. CARRIERE J. GRANIER
E. TURRIERE Ch. BOUHET

PROFESSEURS TITULAIRES :

M.	M. MOUSSERON	Chimie Organique
M.	L. EMBERGER	Botanique
M.	J. P. ROIG	Physique
M.	P. CHATELAIN	Minéralogie et Cristallographie
Mlle	O. TUZET	Zoologie
Mlle	G. CAUQUIL	Chimie Organique
M.	G. COUCHET	Mécanique Supérieure
M.	J. SALVINIEN	Chimie - Physique
Mlle	A. M. VERGNOUX	Physique
M.	J. AVIAS	Géologie
M.	P. VIELES	Chimie

M.	J. RABINOVITCH	Physique (C.S.U. P.)
M.	E. KAHANE	Chimie Biologique
M.	J.J. MOREAU	Mécanique Rationnelle
M.	B. CHARLES	Mathématiques Pures
M.	J. MOTTE	Biologie Végétale
M.	R. JOUTY	Physique
M.	P. DUMONTET	Physique
M.	R. LEGENDRE	Zoologie
M.	I. ASSENMACHER	Physiologie Animale
M.	A. CASADEVALL	Chimie Organique
M.	B. PISTOULET	Physique
M.	Ch. ROUMIEU	Analyse Supérieure
M.	J. ROBIN	Physique
M.	A. POTIER	Laboratoire des Acides Minéraux
M.	R. LAFONT	Physique
M.	R. JACQUIER	Chimie
M.	J. FALGUEIRETTES	Minéralogie
M.	J. RÉGNIER	Chimie
Mme	J. CHARLES	Mathématiques
M.	P. CAILLON	Physique
M.	J. ROUZAUD	Chimie
M.	Ch. SAUVAGE	Botanique
M.	M. H. CHRISTOL	Chimie (E.N.S.I.)
Mme	G. VERNET	Biologie Animale
M.	L. CECCHI	Physique
M.	H. ANDRILLAT	Astronomie
M.	M. SAVELLI	Physique
M.	M. MATTAUER	Géologie
M.	L. EUZET	Zoologie (C.S.U. P.)
M.	C. DELOUPY	Physique
M.	L. GRAMBAST	Botanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mme	M.L. de POUQUES	Botanique (C.S.U. P.)
M.	P. MURAUOUR	Géophysique Appliquée
M.	G. TOURNE	Chimie
M.	J. RÉMY	Géologie
M.	P. DEMANGEON	Géologie
M.	A. BONNET	Botanique
Mme	S. ROBIN	Physique
Mme	Ch. DUBOUL-RAZAVET	Géologie (C.S.U. P.)
M.	E. GROUBERT	Physique

Mme H. GUASTALLA	Biologie Physico-Chimique
M. G. LAMATY	Chimie
M. F. PROUST	Géologie
Mlle A. BAILLETTE	Mathématiques (C.S.U. P.)
M. A. BASSOMPIERRE	Physique
M. R. MARTY	Psychophysiologie
M. M. MAURIN	Chimie
M. N. ROBY	Mathématiques
Mme N. PARIS	Physiologie Végétale

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M. E. AKUTOWICZ	Mathématiques
M. A. MICALI	Mathématiques
M. C. VAGO	Biologie Animale
M. K. KOHLER	Biochimie

MAITRES DE CONFÉRENCES

M. R. GAUFRES	Chimie
M. J. J. SOULIER	Chimie (C.S.U. P.)
M. J. PARIS	Zoologie
M. P. MOLINO	Mathématiques
M. G. BOUGNOT	Physique
M. Y. GUITTON	Physiologie Végétale (C.S.U. P.)
M. F. BOMBRE	Physique (C.S.U. P.)
M. C. PUISSEGUR	Biologie Animale (C.S.U. P.)
M. P. VIALLET	Chimie (C.S.U. P.)
M. L. THALER	Géologie
M. J. LEGRAND	Physiologie Animale
M. M. ROUZEYRE	Physique
M. P. SABATIER	Mathématiques
M. Ch. CASTAING	Mathématiques (C.S.U. P.)

CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT

M. M. LEFRANC	Mathématiques
M. A. STURER	Mathématiques
M. C. BENZAKEN	Mathématiques
Mlle Ch. BARBANCE	Mathématiques (C.S.U. P.)

AVANT - PROPOS

Je suis heureux de pouvoir exprimer ici ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur E. KAHANE.

Je le remercie très sincèrement de m'avoir accepté parmi ses chercheurs, de l'intérêt constant qu'il a porté à mon travail ainsi que des encouragements qu'il m'a toujours prodigués avec bienveillance.

Je remercie Madame H. COLSON-GUASTALLA, Professeur sans chaire, de m'avoir fait l'honneur de juger cette thèse.

Mes remerciements vont également à Monsieur J. MORETTI, Maître de conférences, pour avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury.

Je suis reconnaissant à tous mes camarades de laboratoire de l'atmosphère cordiale qu'ils ont su faire régner.

Que tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation technique et l'impression de cette thèse trouvent ici l'expression de mes remerciements.

Ma qualité de Stagiaire de l'Institut APPERT m'a donné les moyens matériels de mener ce travail, c'est avec reconnaissance que je remercie son Directeur Monsieur DUROCHER.

INTRODUCTION

La carnitine ou β hydroxy- γ butyro-bétaine fut découverte presque simultanément en 1906 par KUTSCHER⁽³⁴⁾ en Allemagne, GULEWITCH et KRIMBERG⁽²⁶⁾ en Russie. En 1907, KRIMBERG proposa la formule brute $C_7H_{15}O_3N$, mais il fallut attendre plus de vingt ans pour que sa structure $N^+(CH_3)_3CH_2CHOHCH_2CO_2^-$ soit établie.⁽⁴⁵⁾

Cette bétaine, constituant du muscle, contenue en grande quantité dans les extraits de viande,⁽⁴⁵⁾ voisine de la choline, fut alors l'objet d'une étude intensive notamment par STRACK et ses collaborateurs⁽⁴⁵⁾ vers 1930.

KAHANE et LEVY⁽³³⁾ en 1938, puis GUGGENHEIM⁽²⁷⁾ en 1940 ont publié une mise au point de ces différents travaux, la bibliographie y est complète sur les études faites sur la carnitine de 1906 à 1940.

Au cours de ses recherches sur la nutrition du ver de farine (Tenebrio molitor), FRAENKEL⁽¹⁸⁾ mit en évidence dans des extraits de levure de bière ou de tissus animaux un principe indispensable à la vie de ces insectes. Il l'appela facteur vitaminique B_t en relation avec son rôle de facteur de croissance. En 1952, il conclut à l'identité de ce composé avec la carnitine.

Depuis dix ans, les nombreux travaux de BATTACHARRAYA, BREMER, FRAENKEL, pour ne citer que les principaux, tendent à démontrer le rôle

universel de la carnitine. Cette bétaine et ses esters sont considérés comme des intermédiaires dans la respiration cellulaire⁽³⁾, le métabolisme des acides gras⁽²³⁾ et des corticostéroïdes⁽¹⁾.

Bien que la carnitine ne soit facteur de croissance que pour le Tenebrio molitor sous sa forme larvaire, ces travaux mettent aussi en évidence une relation entre le taux de carnitine soit libre, soit estérifiée, et la qualité nutritionnelle d'un aliment carné.

L'addition de protéines étrangères et notamment de caséine abaisse cette qualité et corrélativement sa valeur marchande. Il est donc intéressant de pouvoir doser la carnitine dans les tissus et les préparations alimentaires par une méthode simple et précise.

o
o o

L'étude bibliographique nous montre un certain choix de méthodes chimiques ou physico-chimiques pour le dosage des bétaines. Nous avons consacré une partie de notre travail à l'étude expérimentale des différentes possibilités qui s'offrent pour l'extraction, la caractérisation et le dosage de la carnitine, en nous basant sur les méthodes décrites.

Après avoir adopté une technique enzymatique, la plus simple et la plus rapide possible, nous avons vérifié sa facilité d'emploi sur quelques échantillons de produits alimentaires, en nous attachant à doser séparément la carnitine libre et estérifiée, dans la pensée qu'elle pouvait avoir un rôle physiologique ou alimentaire différent suivant la forme chimique. Nous avons enfin étudié, dans les tissus de lapin, l'évolution post-mortem des différentes classes d'esters et leur répartition dans quelques organes en relation avec leur fonction physiologique.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE DU DOSAGE DE LA CARNITINE PAR DES MÉTHODES CHIMIQUES

CHOIX D'UNE TECHNIQUE

I. - EXTRACTION

La carnitine est un cristalloïde extrêmement soluble dans l'eau. Comme pour les autres bétaines, nous avons le choix entre plusieurs méthodes d'extraction, en milieu acide ou neutre.

1° Extraction en milieu acide

Afin d'éliminer la partie protéique de l'échantillon, il est classique de coaguler les protéines en broyant les tissus en milieu acide, dans une solution d'acide perchlorique de 2 à 10 % ou d'acide trichloracétique de 10 à 20 %. L'extraction doit être répétée au moins deux fois sur le même échantillon afin que le culot ne retienne pas de composés solubles.

Ce type d'extraction, s'il a le grand avantage de la rapidité, a l'inconvénient de favoriser l'hydrolyse des esters de bétaines.

2° Extraction en milieu neutre

Dans ces méthodes d'extraction par l'eau, il est nécessaire d'ajouter un agent de coagulation des protéines pour obtenir une solution claire.

Il existe de nombreux agents défécants : sels ou hydroxydes de métaux lourds, plomb⁽⁴⁵⁾, fer⁽³⁰⁾, zinc⁽²⁸⁾; ou alcools : méthanol, éthanol.⁽⁴³⁾

Nous avons expérimenté la défécation ferrique, d'une part parce que nous avons acquis une bonne expérience personnelle de cette méthode lors d'un travail préalable, d'autre part parce qu'elle est souvent utilisée au laboratoire pour des extractions de choline où elle donne d'excellents résultats.

Un broyat de tissus est plongé dans l'eau distillée bouillante, et l'ébullition est maintenue pendant 5 minutes. On bloque ainsi immédiatement toute réaction enzymatique. On ajoute alors 1 ml de sulfate ferrique saturé (1 g/ml) par gramme de l'échantillon, puis on neutralise la solution progressivement par du carbonate de calcium jusqu'à cessation de l'effervescence. On filtre la suspension à chaud sur Büchner. Le gâteau de défécation est remis en suspension dans l'eau chaude et on répète une deuxième, puis une troisième fois l'extraction.

Les filtrats sont rassemblés puis évaporés au bain-marie à 100° jusqu'à un volume final compris entre 5 et 10 ml.

Afin de comparer les résultats et d'éliminer la possibilité d'adsorption toujours à craindre sur hydroxyde ferrique, nous avons mis en œuvre aussi une défécation au méthanol.⁽⁴³⁾

Comme précédemment, on plonge l'échantillon broyé dans dix fois son poids d'eau bouillante, et on agite 10 minutes. Après centrifugation, le culot est à nouveau extrait deux fois. Les eaux d'extraction sont réunies, évaporées au bain-marie à 10 ml. On ajoute un volume de méthanol puis on centrifuge, on décante, lave et concentre enfin à quelques millilitres sans atteindre la siccité.

La comparaison des tableaux **IX** et **X** nous montre les résultats d'extraction avec l'une ou l'autre méthode.

II. - CARACTÉRISATION DE LA CARNITINE

1° Hydrolyse

La carnitine se trouve dans les tissus sous forme libre ou estérifiée. Parmi ces esters, les uns sont hydrophiles, les autres partiellement hydrophobes, ils sont diversement adsorbables, suivant la longueur de la chaîne carbonée. Ils se trouveront donc en milieu aqueux ou resteront dans le résidu de défécation. Comme nous dosons la carnitine sous sa forme libre, nous devons hydrolyser ces différents esters. Les possibilités d'hydrolyse sont nombreuses. Malheureusement la longue durée de la méthode de dosage ne nous permet pas de les tester avec précision sur chacun de nos extraits biologiques.

Nous savons que les esters de choline sont hydrolysés par attaque à l'ébullition en milieu nitrique pendant 4 heures⁽³²⁾. Une attaque à l'acide nitrique ($d = 1,33$) étendu à 40 %, soit 1,5 volume d'eau, pendant 6 heures, en présence de glucose (afin de provoquer la formation de vapeurs nitreuses oxydantes), s'est révélée sans action destructrice sur la carnitine. Les résultats sont consignés dans le tableau **I**.

Tableau I

STABILITÉ DE LA CARNITINE A L'ATTAQUE
PAR L'ACIDE NITRIQUE (d = 1,33) ÉTENDU A 40 %

	Dosage d'azote	Dosage comme periodure
Dosage avant attaque	0,190 g	0,192 g
Dosage après attaque	0,193 g	0,196 g
Ecart	1,5 %	2 %
Pesée de chlorure de carnitine	0,1958 g	

Pour l'hydrolyse de l'hydrosoluble, nous ajoutons à la solution de l'acide nitrique (d = 1,33) pour atteindre une dilution au $\frac{1}{3}$ de l'acide.

Pour l'attaque d'un échantillon total, et non de sa fraction hydrosoluble, nous ajoutons 3 ml d'acide nitrique dilué à 30 % par gramme de matière fraîche, et nous portons à l'ébullition dans une petite fiole munie d'un réfrigérant ascendant rodé.

Au bout de 4 heures et après refroidissement de la solution, on neutralise par la potasse. L'hydrolysate est alors filtré puis concentré au bain marie à 5 ml environ.

2° Séparation sur résine cationique

a) Préparation de l'échantillon

Avant d'effectuer la séparation chromatographique, et pour ne pas saturer la colonne, nous dessalifions l'échantillon par 5 volumes d'alcool méthylique. Le nitrate de potassium précipite.

Le liquide est filtré sur verre fritté n° 4. On redissout le précipité sur le filtre par quelques ml d'eau chaude, et on répète la précipitation méthanolique.

Les solutions sont évaporées au bain-marie. Le résidu, repris par quelques ml d'eau, est destiné à être placé en haut de la colonne.

b) Préparation de la résine

Nous utilisons une résine Dowex x 8 200 - 400 mesh. Une résine d'un degré de réticulation 12 à un débit très faible, et nous n'avons pas constaté d'amélioration pour la séparation.

Afin d'éliminer les grains trop fins et de former la résine, environ 30 g de celle-ci sont mis en suspension dans l'acide chlorhydrique 6 N. Après une demi-heure de repos on décante la phase liquide. Cette opération est répétée jusqu'à ce que le surnageant soit incolore. On remplit avec cette résine une colonne de 1,5 cm de diamètre intérieur, sur une hauteur de 60 cm. L'excès d'ions chlorures est éliminé par lavage à l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent ait un pH supérieur à 4.

c) Séparation et identification de la carnitine

L'extrait préparé et contenant la carnitine est placé en haut de la colonne. Celui-ci est adsorbé sur la résine qui est lavée par trois fois 5 ml d'eau distillée. On veille à conserver 1 cm de liquide au-dessus du niveau de la résine qui ne doit jamais venir à sec.

La carnitine est éluée par l'acide chlorhydrique N.⁽²¹⁾ Afin d'obtenir un débit régulier et suffisant (1 ml par minute) on applique à l'effluent une pression d'air comprimé maintenue constante à l'aide d'un régulateur à mercure.

On recueille des fractions d'environ 5 ml sur un collecteur de fractions "Pleuger" réglé sur base de temps. La colonne à double paroi est thermostatée à 40° pour améliorer la séparation.

Afin d'identifier qualitativement la carnitine dans chacune des fractions nous étudions systématiquement leur chromatogramme sur plaque mince. Nous employons des plaques de verre 20 x 20 ou 5 x 20 recouvertes d'une couche de Kieselgel G Merck de 250 μ d'épaisseur, préparé en mélangeant 30 g de Kieselgel à 60 ml d'eau.

Après une activation des plaques par la chaleur (30 mn à 110°) on applique des prises d'essais de 5 à 10 μ l à l'aide d'une microseringue. La cuve tapissée de papier Joseph est saturée de vapeur du système solvant⁽¹⁷⁾:

Méthanol 75 volumes
Ammoniaque (d = 0,93) diluée à 25 %.. 25 volumes.

Afin de tester cette colonne :

- Nous avons vérifié qu'il n'y a pas de rétention de carnitine sur la colonne. Après introduction de 5,4 mg de chlorhydrate de carnitine, le pourcentage de récupération est indiqué au tableau **II**.

Dans les tubes contenant la carnitine, celle-ci a été identifiée sur couche mince comme indiqué plus haut.

- Nous avons vérifié également que la séparation d'un mélange synthétique de divers ammoniums quaternaires est bonne.

Un mélange de chlorhydrate de choline $\text{Cl} (\text{CH}_3)_3 \text{N} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{OH}$
de chlorhydrate de bétaine $\text{Cl} (\text{CH}_3)_3 \text{N} \text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{H}$
de chlorhydrate de carnitine $\text{Cl} (\text{CH}_3)_3 \text{N} \text{CH}_2 \text{CHOH} \text{CH}_2 \text{CO}_2 \text{H}$
est introduit sur la colonne.

5 μ l de chaque fraction recueillie à la sortie de la colonne par le collecteur de fractions ont été appliqués sur couche mince. Les chromatogrammes obtenus sont représentés à la page suivante.

Fractions 12 à 37

B. 

A. 



Fractions 13 à 62



Spots : A. Carnitine B. Bétaïne C. Choline

Système solvant : méthanol - ammoniac 75 / 25 V/V

Tableau II

RÉCUPÉRATION DE LA CARNITINE PURE
APRÈS PASSAGE SUR COLONNE

	mg de chlorhydrate de carnitine		Ecart %
	Introduits sur la colonne	Recueillis après passage sur colonne	
Pesée	5,4	5,5	+ 2
Dosage d'azote	5,3	5,1	- 4
Dosage comme periodure	5,3	5,2	- 2

Tableau III

POURCENTAGES DE RÉCUPÉRATION
APRÈS FRACTIONNEMENT D'UN MÉLANGE SYNTHÉTIQUE

	mg d'échantillon introduits	mg d'échantillon recueillis	% de récupération
Carnitine	17,0	16,4	96
Bétaine	15,2	15,0	98,5
Choline	13,8	12,5	90

La carnitine est éluee en premier, suivie par la bétaine, la choline est éluee en dernier. Pour cette dernière le pic est très aplati ce qui explique le pourcentage important de perte.

Les bétaines et la choline ont été dosées comme periodure ; les pourcentages de récupération sont indiqués au tableau **III**.

III. - DOSAGE

1° Dosage comme triméthylamine

On connaît depuis longtemps la possibilité d'hydrolyser les bases possédant un ammonium quaternaire.⁽³⁶⁾ D'après LINTZEL la carnitine en particulier cède quantitativement son azote dans une solution à 75 % en poids de potasse à 120° en 5 heures. On peut entraîner la triméthylamine (T.M.A.) formée par un faible courant d'air, et la recueillir dans 5 ml d'acide chlorhydrique $\frac{N}{50}$. La triméthylamine peut être estimée par retour de l'acide restant. Si nous comptons comme limite de sensibilité 0,1 ml d'acide chlorhydrique $\frac{N}{50}$ neutralisé par la T.M.A., cela correspond à $2 \cdot 10^{-6}$ moles de T.M.A. donc de carnitine soit 0,32 mg.

Nous pouvons aussi doser la T.M.A. recueillie par la méthode colorimétrique de DYER.⁽¹⁵⁾ A une solution neutre contenant 0,016 mg à 0,16 mg de carnitine soit 0,002 à 0,02 mg d'azote, on ajoute :

1 ml de formaldéhyde

10 ml de toluène

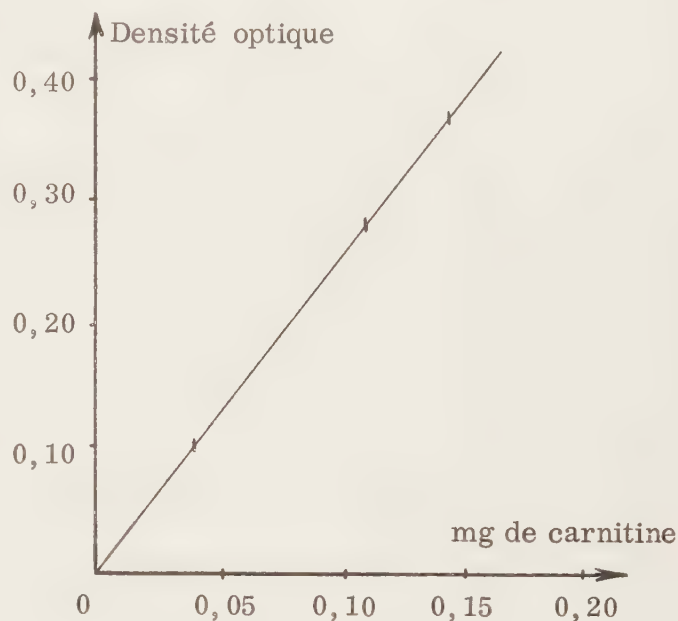
3 ml d'une solution de carbonate de potassium à 1 g/ml

4 ml de solution à doser.

On agite 40 à 60 fois.

On prélève 5 ml de la solution de toluène séchée sur sulfate de sodium. Dans un tube, on ajoute 5 ml d'une solution d'acide picrique à 0,02 % dans le toluène. Le complexe coloré formé est dosé à 420 m μ .

La courbe d'étalonnage ci-contre a pu être obtenue avec la T.M.A. pure à condition d'opérer sur une moyenne de 5 à 6 dosages car l'extraction par le toluène est irrégulière. La sensibilité réelle est abaissée à $0,02 \times 5 = 0,1$ mg de carnitine ; si celle-ci est suffisante, la durée totale de cette méthode nous l'a fait abandonner.



2° Dosage comme Reineckate

Les bétaines à l'état cationique précipitent sous forme de Reineckate en présence d'un excès de sel de Reinecke $[(\text{NH}_3)_2 \text{Cr} (\text{SCN})_4] \text{NH}_4^+$.

La prise d'essai amenée à 10 ml est acidifiée par 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Après l'addition de 5 ml d'une solution de sel de Reinecke à 2 % dans l'eau, on l'abandonne 3 heures à la glacière.

Quand la précipitation est terminée on filtre et on lave deux fois par 4 ml de réactif et une fois par l'acide chlorhydrique décimormal afin de ne pas entraîner le précipité (soluble en milieu neutre) par dissolution dans les eaux de lavage.

Le précipité est alors dissous sur le filtre par l'eau bouillante.

Son dosage s'effectue par la méthode de PARNAS et WAGNER. L'anion est décomposé à chaud par la soude, l'ammoniaque dégagé est dosé par l'acide sulfurique $\frac{N}{50}$ en présence d'un indicateur mixte (solution de 1 g de rouge de méthyle et 0,5 g de vert de bromocrésol dans 100 ml d'éthanol à 95°).

A 1 ml d'acide sulfurique versé correspond 10^{-5} moles soit 1,61 mg d'ion carnitine dosé.

Les résultats sont consignés dans le tableau **IV**. Dans les meilleures conditions expérimentales, la précision obtenue sur 4 ou 5 dosages est proche de 2%. Elle est acceptable, malheureusement, si la méthode est simple et rapide, les quantités exigées pour le dosage sont trop importantes pour envisager une application à des milieux biologiques.

3° Dosage comme periodure

Les bétaines précipitent en présence d'un excès de réactif iodo-ioduré (160 g d'iode et 240 g d'iodure de potassium par litre) sous forme $I_n IN (CH_3)_3 R$. Le facteur n diffère selon la nature de la bétaine.

La précipitation est terminée en 3 heures dans des tubes de centrifugeuse cylindro-coniques, refroidis entre 0 et 5°.

Après centrifugation au froid pendant 5 minutes à 6.000 g on siphonne le surnageant avec un capillaire muni à son extrémité d'un filtre Durieux extra-rapide. De cette manière on lave deux fois ce précipité à l'eau glacée, en évitant de le remettre en suspension pour en dissoudre le moins possible.

Le précipité est ensuite dissous dans les tubes par quelques ml d'alcool éthylique et dosé par le thiosulfate $\frac{N}{50}$ jusqu'à décoloration. Le virage est très net sans que l'on ait besoin d'ajouter de l'empois d'amidon.

Tableau **IV**

DOSAGE DE LA CARNITINE COMME REINECKATE

ml d'échantillon	ml $\text{H}_2\text{SO}_4 \frac{\text{N}}{50}$	moyenne ml $\text{H}_2\text{SO}_4 \frac{\text{N}}{50}$	mg ions carnitine mesurés	mg ions carnitine calculés	Ecart %
10	11 10,8 10,5 10,2	10,6	16,9	16,2	- 4,1
5	5,25 5,15 5,15 5,18	5,18	8,28	8,10	+ 2,2
2	2,20 2,15 2,15 2,15 2,10	2,15	3,44	3,24	+ 6,2
1	1,20 1,15 1,15 1,05	1,15	1,74	1,62	+ 7,4

Solution mère à 1,62 mg d'ion carnitine par ml.

a) Dosage comme periodure de la carnitine

Nous avons testé cette méthode sur des échantillons de carnitine de poids de plus en plus faible. Le nombre d'atomes d'iode dosables est 5⁽³³⁾.

Le periodure de carnitine ne précipitant pas en milieu neutre, nous ajoutons une goutte d'acide chlorhydrique $d = 1,18$ par tubes.

D'après les résultats du tableau **V** nous voyons que la marge d'erreur par excès est considérable. Ceci tient à la nature des cristaux précipités. De courtes aiguilles cristallines forment, après centrifugation, un entrelac au fond du tube. Cet enchevêtrement retient une quantité importante de réactif, alors que le periodure de choline est en lamelles qui s'appliquent de façon compacte les unes sur les autres.

b) Dosage comme periodure de l'éthylate de carnitine

Nous avons essayé d'améliorer les résultats en dosant l'éthylate de carnitine. L'estérification bloquant la fonction acide il est possible de précipiter cet ester en milieu neutre.

● Obtention de l'éthylate

Par ébullition à reflux, pendant 2 heures, de la carnitine en solution dans l'alcool absolu de normalité N en acide chlorhydrique, on obtient de l'éthylate. La pureté de l'ester obtenu est contrôlée par chromatographie sur couche mince dans le système solvant

méthanol - ammoniac 75 - 25 V/V.

Il n'y a pas de traces de carnitine libre, celle-ci ayant un R_f très différent de celui de l'ester (spots A et B) se détecterait facilement sur la plaque.



Spot A : éthylate de carnitine
Spot B : carnitine

Tableau V

DOSAGE DE LA CARNITINE COMME PERIODURE

ml d'échantillon	ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \frac{\text{N}}{50}$	moyenne ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \frac{\text{N}}{50}$	mg ions carnitine mesurés	mg ions carnitine calculés	Ecart %
5	11,8 11,0 10,2 12,7 11,5 13,6 11,8	11,7	7,58	7,10	+ 6,7
2	5,19 5,20 4,92 4,92 5,12 5,00 4,88	5,08	3,22	2,84	+ 13
1	2,95 2,75 2,4 2,5 2,8	2,7	1,74	1,42	+ 23

Solution à 1,73 g de chlorure de carnitine par litre
soit 1,42 mg d'ion carnitine par ml.

● Détermination du nombre d'iodes

L'éthylate est précipité en milieu neutre sous forme de periodure puis lavé plusieurs fois à l'eau glacée pour enlever toute trace de réactif tout en dissolvant le moins possible le précipité. Celui-ci est très mobile et n'adhère pas aux parois. Il ne retient pas la solution de réactif. Le précipité humide est mis à dessécher, en présence d'anhydride phosphorique, dans un dessiccateur. Quand le periodure est sec, on renouvelle le desséchant et on ajoute une capsule contenant des cristaux d'iode. Le précipité réabsorbe l'iode perdu par lavage pour former quantitativement le periodure. La pesée est effectuée au bout de 1/2 et 3 mois. Entre les deux dernières mesures la différence est inférieure à 0,2 %.

Après dissolution des échantillons dans 5 ml de méthanol, l'iode libre est dosé par le thiosulfate 0,1 N, l'iode total par la méthode de MOHR au nitrate d'argent. L'iode ionisé est mesuré par différence de ces deux chiffres.

Les résultats du tableau **VI** nous montrent que nous avons 6 iodes dosables au thiosulfate. Le nombre et la concordance des résultats nous permettent d'utiliser cette valeur.

● Dosage de la carnitine après précipitation sous forme de periodure de l'éthylate de carnitine

Après avoir précipité, puis recueilli le periodure en milieu neutre par le réactif iodo-ioduré, dans les mêmes conditions que pour la carnitine non estérifiée, on le dose par le thiosulfate après dissolution dans le méthanol. Les résultats sont indiqués aux tableaux **VII** et **VIII**.

La précision et la simplicité sont améliorées par rapport aux méthodes précédentes, mais la quantité minimale n'est que deux fois inférieure à celle exigée par la méthode de dosage comme Reineckate. La densité du précipité est telle que son volume devient très faible, donc les pertes aux lavages très importantes pour des quantités de carnitine inférieures à 1 mg.

Tableau **VI**

DÉTERMINATION DU NOMBRE DE MOLÉCULES D'IODE
DU PERIODURE D'ÉTHYLATE DE CARNITINE

Poids en g (periodure)	A Nbre de moles d'iode libre	B Nbre de moles d'iode ionisé	C Nbre de moles d'azote	Rapport $\frac{A}{C}$	Rapport $\frac{A}{B}$
0,1428	0,81 10^{-3}	0,140 10^{-3}	0,137 10^{-3}	5,9	5,8
0,1394	0,79 10^{-3}	0,135 10^{-3}	0,136 10^{-3}	5,8	5,84
0,4257	2,44 10^{-3}	0,410 10^{-3}	0,402 10^{-3}	6,0	5,95
0,4433	2,55 10^{-3}	0,425 10^{-3}	0,400 10^{-3}	6,4	6,0
0,0875	0,57 10^{-3}	0,100 10^{-3}	0,099 10^{-3}	5,7	5,7

Tableau **VII**

DOSAGE DE L'ÉTHYLATE DE CARNITINE COMME PERIODURE
EN MILIEU NEUTRE

ml solution étalon	ml thiosulfate N versé $\frac{\quad}{20}$	Moyenne ml thiosulfate N versé $\frac{\quad}{20}$	Ethylate de carnitine		Ecart %
			mg d'ions mesurés	mg d'ions calculés	
5	5,52	5,52	8,85	8,80	< 1
	5,52				
	5,56				
	5,48				
	5,52				
	5,52				
2	2,18	2,22	3,50	3,52	< 1
	2,20				
	2,24				
	2,20				
	2,24				
	2,22				
1	1,09	1,12	1,73	1,76	< 1,5
	1,15				
	1,10				
	1,14				
	1,12				
	1,12				

Solution étalon à 1,76 mg d'ion éthylate par ml.

Tableau **VIII**

DOSAGE DE L'ÉTHYLATE DE CARNITINE COMME PERIODURE
EN MILIEU NEUTRE

ml solution étalon	ml thiosulfate N versé $\frac{\quad}{100}$	moyenne ml thiosulfate N versé $\frac{\quad}{100}$	Ethylate de carnitine		Ecart %
			mg d'ions mesurés	mg d'ions calculés	
5	2,60	2,60	0,82	0,88	7
	2,57				
	2,60				
	2,60				
	2,59				
	2,61				
2	0,64	0,65	0,236	0,352	33
	0,63				
	0,65				
	0,70				
	0,60				
	0,62				
1	0,70				
	0,22	0,21	0,076	0,176	43
	0,18				
	0,20				
	0,25				
	0,10				
	0,30				

Solution étalon à 0,176 mg d'ion éthylate par ml.

Nous avons essayé, en profitant de la forme du précipité, d'accroître la sensibilité de la méthode en utilisant un dosage néphélométrique.⁽²⁾

On ajoute 1 ml de réactif (80 g d'iode + 120 g d'iodure de potassium par litre) pour 10 ml de solution à pH 7. Après 3 heures à la chambre froide, on mesure la lumière diffusée dans une direction perpendiculaire au faisceau incident. On utilise un spectrophotomètre Jobin et Yvon, type "Maroc" équipé d'un périscope. On fait la mesure à 590 mμ. Cette longueur d'onde a été déterminée d'après le spectre ci-contre.

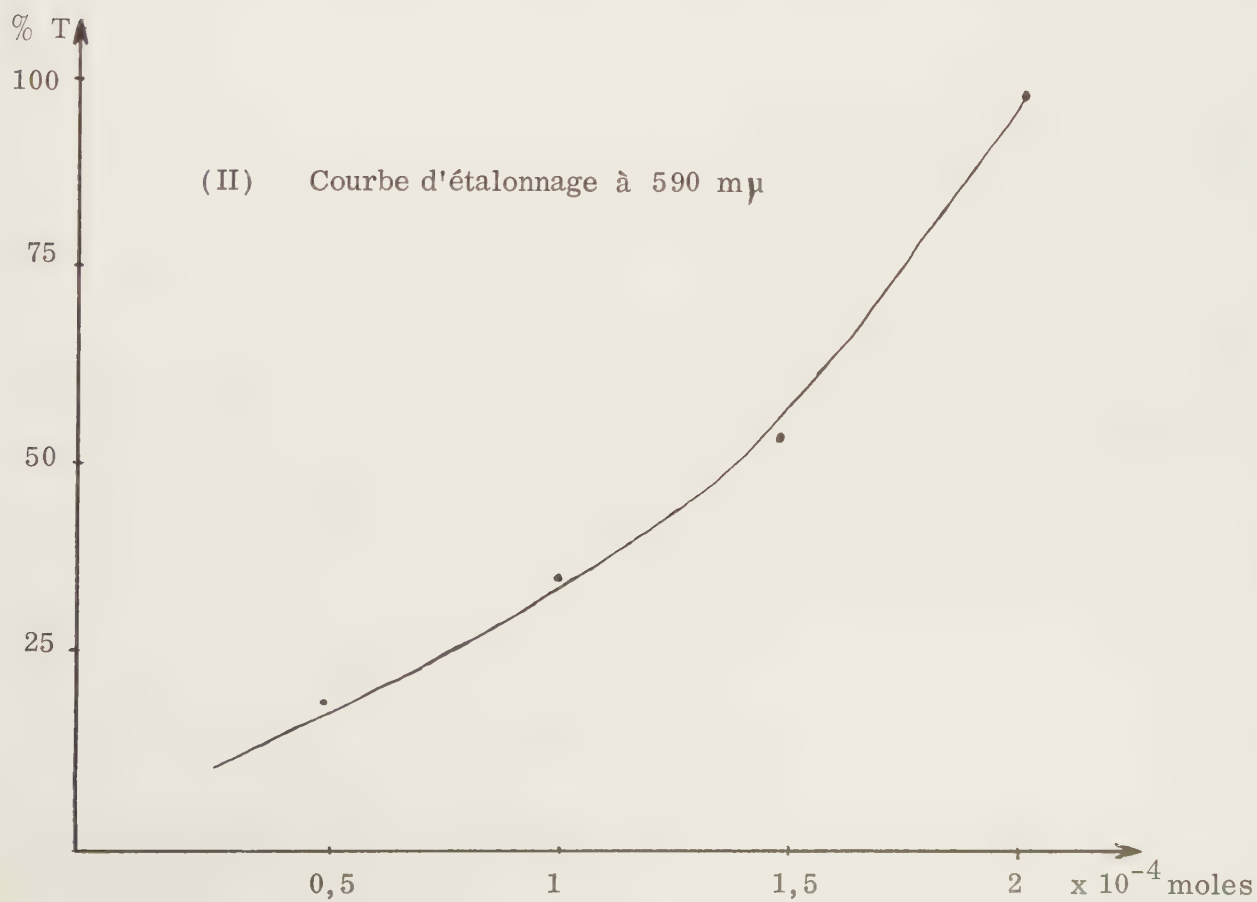
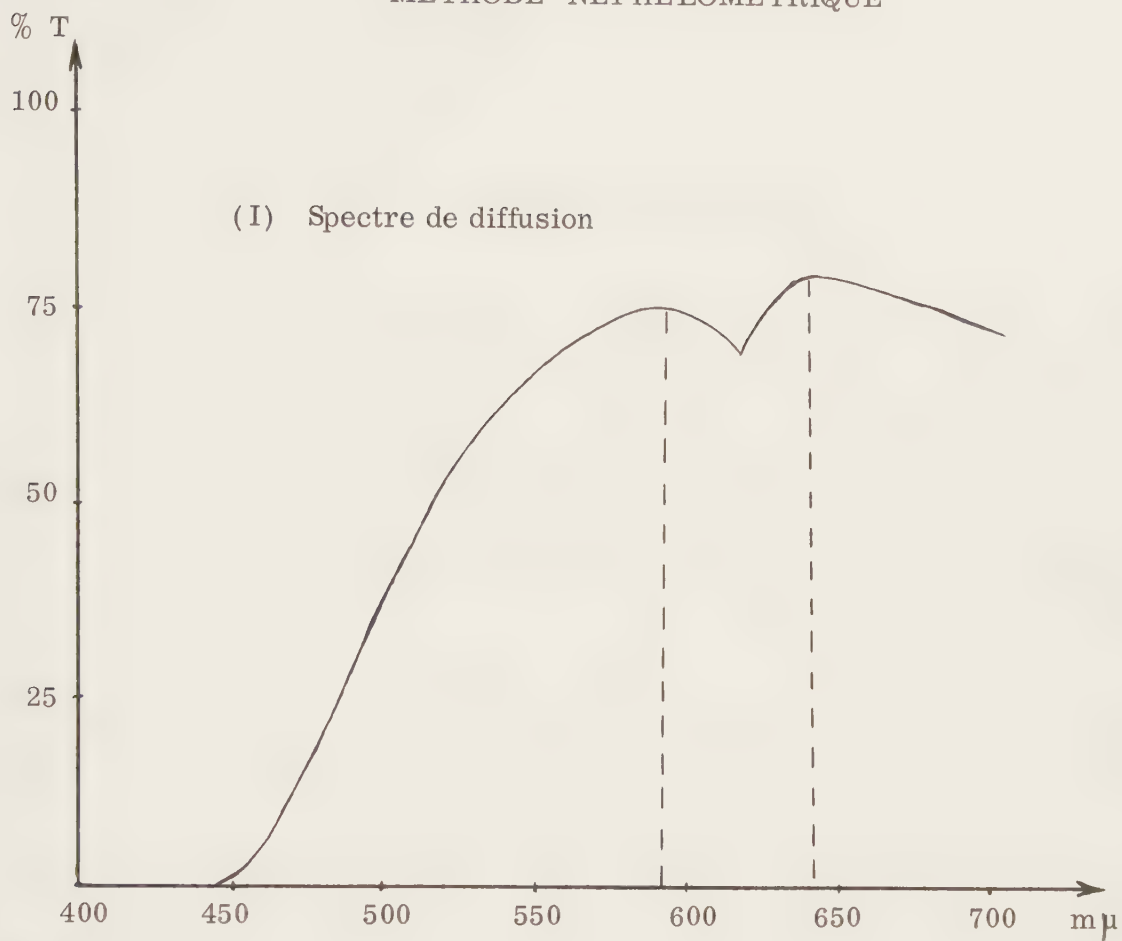
La courbe d'étalonnage est obtenue en prenant la valeur arbitraire 100 pour une suspension correspondant à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ moles de carnitine. Les points expérimentaux ne sont pas alignés mais la reproductibilité est de 5 %.

Il n'a pas été possible d'accroître davantage la sensibilité. Pour des concentrations inférieures, il y a une redissolution du précipité pendant la lecture car elle se fait à température ordinaire. Cette méthode n'est donc notée que pour mémoire puisqu'elle n'apporte pas le gain de sensibilité espéré.

IV. - CONCLUSION

Parmi les méthodes expérimentées en milieu synthétique, il nous apparaît que le meilleur processus d'analyse consiste en une extraction de la carnitine à l'eau bouillante suivie d'une défécation ferrique de l'échantillon. La carnitine est isolée à partir de l'extrait soluble sur colonne de résine échangeuse d'ions Dowex 50. Après élution par l'acide chlorhydrique N la carnitine est récupérée à 96 %. La fraction étalonnée comme contenant la carnitine est alors estérifiée quantitativement par l'alcool éthylique en milieu acide avant qu'on ne la dose

MÉTHODE NÉPHÉLOMÉTRIQUE



comme periodure. La phase finale de ce dosage n'entraînant pas d'erreurs supérieures à 2 %. Nous pouvons espérer avoir des chiffres significatifs à 6 % près.

Nous n'avons pas étudié les méthodes de dosage colorimétrique du Reineckate⁽³⁷⁾ ou du periodure⁽⁴⁹⁾ de carnitine. Si la sensibilité de la colorimétrie est grande la précision est toujours limitée par le lavage et l'isolement du précipité de periodure ou de Reineckate. Le gain obtenu par la méthode physique n'apporte aucune amélioration à la sensibilité de la partie chimique du dosage.

APPLICATION AUX MILIEUX BIOLOGIQUES

I. - DOSAGE SUR UN MILIEU STABILISÉ

Afin de tester l'ensemble de la méthode, nous avons d'abord fait des dosages sur un extrait concentré de viande. Sur un extrait Liebig nous trouvons 21 - 21,5 et 20 mg de carnitine par gramme de matière initiale soit 25 - 26,5 et 26,8 mg par gramme de matière sèche. E. STRACK par une méthode différente⁽⁴⁵⁾ trouve 18 mg / g de matière fraîche. Les résultats sont comparables à 15 % près ce qui est acceptable compte tenu du fait que cet auteur ne s'est pas rapporté à la matière sèche et aussi de la différence possible d'un échantillon à l'autre.

II. - DOSAGE SUR DES HOMOGÉNATS DE MUSCLE

La présence d'un abattoir à Montpellier nous a permis de faire des prélèvements de muscle immédiatement après abattage.

Nous avons choisi d'étudier le diaphragme parce que c'est un muscle extrêmement sollicité, dont le métabolisme cellulaire doit être actif et qui par conséquent doit être riche en carnitine. D'autre part c'est un muscle facile à prélever sans abaisser la valeur marchande de l'animal destiné à la boucherie.

Sur des vaches abattues et dépecées immédiatement l'échantillon de muscle est recueilli sur azote liquide. On fait l'extraction dès le retour au laboratoire.

Afin d'étudier la reproductibilité des dosages et la répartition des différentes formes de carnitine nous avons fait des séries de déterminations sur des parties aliquotes (10 à 20 g) d'un broyat homogène de 100 g de muscle qui est préparé dès que l'échantillon est dégelé et après l'avoir débarrassé de sa graisse.

Les résultats exprimés en mg de chlorhydrate de carnitine par gramme de matière sèche sont consignés sur les tableaux **IX** à **XIV** donnant les chiffres obtenus dans chaque série de répétition.

Dans ces tableaux, il apparaît une importante quantité d'esters de carnitine hydrosoluble (de 1 à 2 mg/g sec) par rapport à la carnitine libre (de 0,1 à 0,7 mg/g sec). Il semble qu'il y ait deux fois moins de carnitine libre que de carnitine soluble estérifiée.

Tableau **IX** DÉFÉCATION FERRIQUE

Vache : 2 ans (Animal I)

Tableau **X** DÉFÉCATION AU MÉTHANOL

Vache : 2 ans (Animal I)

Tableau **XI** DÉFÉCATION FERRIQUE

Vache : 6 ans (Animal II)

Tableau **XII** DÉFÉCATION FERRIQUE

Vache : 8 ans (Animal III)

Tableau **XIII** DÉFÉCATION FERRIQUE

Vache : 8 ans (Animal III)

Viande lyophilisée

	mg de chlorhydrate de carnitine par g de matière sèche			Ecart extrême (%)
C.H.L.	0,13	0,32	0,16	57
C.H.E.	1,77	2,08	—	10
C.H.T.	1,9	2,4	—	21

	mg de chlorhydrate de carnitine par g de matière sèche			Ecart extrême (%)
C.H.L.	0,20	0,25	0,22	20
C.H.E.	1,40	1,65	1,28	22
C.H.T.	1,6	1,9	1,5	21

	mg de chlorhydrate de carnitine par g de matière sèche			Ecart extrême (%)
C.H.L.	0,46	0,37	—	20
C.H.E.	2,29	0,98	—	57
C.H.T.	2,76	1,36	—	50

	mg de chlorhydrate de carnitine par g de matière sèche			Ecart extrême (%)
C.H.L.	0,72	0,50	0,45	37
C.H.E.	1,28	2,90	2,35	58
C.H.T.	2	3,4	2,8	41

	mg de chlorhydrate de carnitine par g de matière sèche			Ecart extrême (%)
C.H.L.	0,66	0,77	0,37	52
C.H.E.	1,10	2,29	2,23	54
C.H.T.	1,76	3,06	2,60	44

C.H.L. : Carnitine hydrosoluble libre
 C.H.E. : Carnitine hydrosoluble estérifiée
 C.H.T. : Carnitine hydrosoluble totale

Quant à la carnitine totale sa teneur de 6 à 8,5 mg/g nous indique que plus de la moitié de celle-ci est sous forme non hydrosoluble (tableau **XIV**).

Tableau **XIV**

MESURES DE CARNITINE TOTALE SUR LE DIAPHRAGME DE VACHE

	Résultats en mg de chlorhydrate de carnitine par g de matière sèche			Ecart extrême (%)
Animal I (2 ans)	7,9	7,5	7,7	5
Animal II (6 ans)	6,0	6,4	6,5	8
Animal III (8 ans)	8,5	8,4	8,2	3,5

Dans une étude bibliographique nous n'avons trouvé aucun chiffre d'analyse sur le muscle de bovin. Les chiffres fournis (cf tableaux **XIX** et **XX**) montrent de grandes variations d'une espèce à l'autre, d'un organe à l'autre.

PEARSON et coll. donnent des chiffres pour le diaphragme chez le rat : 0,045 mg/g frais de carnitine libre et 0,07 mg/g frais de carnitine totale soit si nous comptons 20% de matière sèche 0,18 mg/g et 0,28 mg/g de matière sèche, c'est à dire peu d'esters en comparaison avec nos chiffres. Le chiffre de carnitine totale n'est pas donné. D'après BROEKHUYSEN et coll. le muscle de chien contient 4,1 mg de carnitine totale, le muscle de rat seulement 1 mg environ soit également des résultats bien inférieurs à nos chiffres. Cependant l'espèce étant différente nos fortes valeurs peuvent correspondre à une réalité physiologique.

Lorsque nous considérons les écarts des résultats pour des dosages effectués sur des parties aliquotes d'un même homogénat, la validité de nos résultats paraît plus douteuse. Si pour des mesures de carnitine totale nous ne trouvons des écarts que de 3 à 8 %, ceux-ci atteignent 20 à 50 % que ce soit pour la carnitine hydrosoluble libre (C.H.L.) ou la carnitine hydrosoluble totale (C.H.T.) les valeurs de carnitine hydrosoluble estérifiée étant obtenues par différence (C.H.T. — C.H.L.).

Ces écarts sont inacceptables et avant de poursuivre une étude des teneurs en carnitine dans les tissus nous devons améliorer la reproductibilité du dosage ou abandonner cette méthode qui est peut être mal adaptée au dosage en milieu biologique.

III. - DISCUSSION DE LA VALIDITÉ DE LA MÉTHODE CHIMIQUE DE DOSAGE

Etudions de façon critique chacune des étapes du dosage en fonction de nos résultats.

1° Extraction

Pour la carnitine hydrosoluble libre les variations sont de l'ordre de 50 % pour une défécation ferrique (cf tableau **IX**) et de 20 % pour une défécation au méthanol (cf tableau **X**) les chiffres variant de 0,13 à 0,32 mg/g dans le premier cas et de 0,20 à 25 mg/g dans le second cas. Ceci nous suggère qu'il peut y avoir adsorption sur le gâteau de défécation non seulement des esters mais aussi de la carnitine.

D'autre part, lors de l'extraction à chaud il peut y avoir des hydrolyses partielles des différents esters venant fausser la répartition réelle de celle-ci.

2° Isolement

Sur colonne Dowex l'élution par l'acide chlorhydrique N peut favoriser également des hydrolyses partielles des formes combinées.

Le contenu des tubes est repéré par chromatographie sur couche mince, la sensibilité maximale est de 0,5 µg. Nous appliquons 20 µl de solution, il faut donc au moins 0,12 mg pour 5 ml dans chaque tube pour que la carnitine soit détectée. Afin d'éviter de délaier des tubes contenant la carnitine nous concentrons les tubes extrêmes du pic d'élution avant de les chromatographier une seconde fois, la perte due au manque de sensibilité est alors négligeable.

3° Dosage

L'étape finale est le dosage de la carnitine sous forme de periodure de son ester éthylique. L'éthylation est complète en milieu pur, nous vérifions sur couche mince, pour chaque éluat, qu'elle est aussi complète sur des extraits biologiques. Après précipitation du periodure, le chiffre obtenu est la moyenne de 4 dosages sur des parties aliquotes. Nous ne constatons pas de dispersion anormale de ces chiffres.



En résumé, il semble que les écarts entre deux dosages soient dus à des adsorptions ou à des hydrolyses partielles lors de l'extraction et de la séparation des différentes formes de carnitine. Cette méthode chimique est mal adaptée à une étude de ces différentes formes.

D'autre part le manque de sensibilité de cette méthode nous oblige à

travailler sur des quantités importantes d'échantillons (plus de 10 g) donc de faire des prélèvements sur de gros animaux.

Le temps assez long qui s'écoule entre la mort de l'animal et l'excision du tissu (1 heure environ) peut entraîner des erreurs dues à des hydrolyses post-mortem non reproductibles.

Enfin la longue durée de la méthode nous empêche d'avoir les chiffres, nombreux, nécessaires à une étude approfondie et rend difficile un dosage de routine sur un échantillonnage important en chimie alimentaire.

Nous avons recherché une méthode permettant un dosage spécifique de la carnitine dans le milieu d'extraction afin d'éviter les hydrolyses dues aux longs traitements de la méthode précédente.

Nous avons écarté la méthode de FRIEDMAN⁽²⁰⁾ qui consiste à complexer l'éthylate de carnitine avec le bleu de bromophénol en milieu alcalin, d'extraire ce complexe coloré par le dichloro-éthane et de mesurer la densité optique de la solution organique à 600 mμ. Cette méthode plus spécifique que la précipitation par le periodure nécessite cependant, pour avoir des chiffres valables, une séparation préalable.^(8 - 13)

Si elle a l'avantage d'une amélioration de sensibilité, elle a toujours l'inconvénient d'une durée s'accordant mal avec un dosage de routine.

o
o o

Nous avons été conduit à mettre en œuvre une méthode enzymatique dont la spécificité permet un dosage direct dans le milieu d'extraction.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DU DOSAGE DE LA CARNITINE PAR UNE MÉTHODE ENZYMATIQUE

PRINCIPE

Pour l'acétyl coenzyme A la paroi mitochondriale est une barrière infranchissable. Différents esters porteurs de chaînes acyls sont par contre capables de la traverser⁽²³⁾.

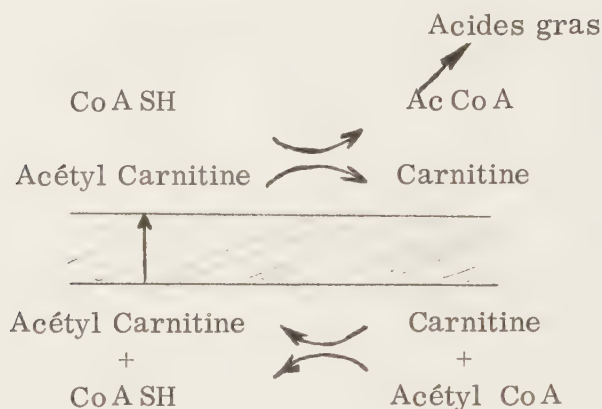
Grâce à la carnitine un transfert du radical acétyl peut s'effectuer de part et d'autre de la membrane en présence de carnitine acétyl transférase.

Cet acétyl CoA : Carnitine O Acétyl transférase (E. C. 2. 3. 1. 7.)^{*} catalyse la réaction

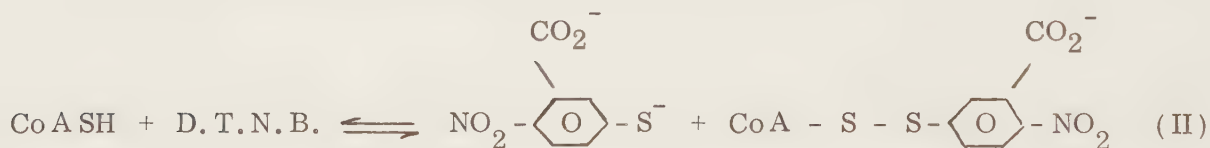


* D'après la nomenclature internationale.

Il permet l'échange schématisé ci-dessous :



La carnitine libre présente permet la libération d'une quantité équimoléculaire de CoA SH libre. ELLMAN⁽¹⁶⁾ a décrit la combinaison du groupe sulfhydryl avec l'acide 5,5' Dithiobis 2 nitrobenzoïque (D.T.N.B.) pour former un thiophénolate qui absorbe à 412 mμ ($\epsilon = 13,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



Sous des conditions dans lesquelles la concentration initiale en CoA libre, carnitine acétyl transférase et D.T.N.B. restent constants, il est possible d'effectuer un dosage colorimétrique à 412 mμ⁽³⁸⁾.

Par cette méthode, si l'on peut isoler l'enzyme spécifique, il n'est plus nécessaire d'extraire préalablement la carnitine. On peut la doser directement dans le milieu d'extraction.

La principale difficulté est d'obtenir un enzyme suffisamment pur pour être spécifique.

Nous avons donc recherché une méthode d'extraction de l'enzyme qui nous fournisse un réactif spécifique avec la plus grande économie possible de temps et de matériel.

PRÉPARATION DE L'ENZYME

I. - A PARTIR DU MUSCLE DE PIGEON

Le muscle de poitrine du pigeon est riche en enzyme recherché. Nous avons obtenu des extraits enzymatiques en suivant le protocole expérimental décrit par PEARSON et TUBBS⁽¹⁰⁾.

1° Extrait protéique

Les pigeons sont décapités. Le muscle de poitrine est immédiatement découvert puis détaché de l'animal. Il est aussitôt plongé dans l'azote liquide de façon à prévenir toute dégradation. Toutes les opérations suivantes sont faites en chambre froide entre 0 et +5°C.

Environ 600 g de muscle (provenant de 12 pigeons) sont coupés en dés après avoir été laissés dégeler. On broye les tissus au "Turmix" pendant 5 minutes par portions de 100 g avec 200 ml de KCl 0,4 M contenant 20 % d'éthanol. La pâte obtenue est ensuite homogénéisée à l'"Ultra-Turrax" dans un becher de 5 litres en présence de 600 ml de la solution saline.

L'homogénat est centrifugé à 25.000 g pendant 10 mn, filtré à travers une mousseline de nylon pour retenir les lipides surnageants. Ce filtrat

est alors dialysé 8 heures contre trois fois 5 litres de tampon phosphate $2 \cdot 10^{-3}$ M à pH 7,5 en présence d'E.D.T.A. $5 \cdot 10^{-3}$ M.

Le précipité résultant de la dialyse est éliminé par centrifugation de 15 mn à 15.000 g.

Le résidu d'extraction peut être repris une seconde fois par homogénéisation à l'Ultra-Turrax avec 1.200 ml de la solution de KCl.

Les dialysats sont ensuite fractionnés.

2° Fractionnements

a) Par le sulfate d'ammonium

On ajoute du sulfate d'ammonium jusqu'à 50 % de saturation, soit 312 g/l. Après 24 heures de repos on centrifuge 30 mn à 15.000 g.

On porte la concentration du surnageant à 62,5 % en sulfate d'ammonium en ajoutant 57 g de sel par litre.

Après 24 heures, on centrifuge 30 mn à 15.000 g. Le précipité est repris par 200 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5.

On dialyse et on élimine, le précipité formé, dans les mêmes conditions que précédemment.

b) Par l'acétone

Le dialysat est refroidi à 0°, puis l'acétone froid est versé lentement pour donner une concentration finale de 32 % en volume.

La solution est gardée à - 5° pendant 12 heures. Le précipité est recueilli par centrifugation de 3 mn à 29.000 g. Il est ensuite redissous dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 puis dialysé afin d'éliminer les dernières traces d'acétone.

c) Par D.E.A.E. cellulose

On ajoute la solution précédente au sommet d'une colonne de D.E.A.E. cellulose équilibrée par du tampon phosphate $2 \cdot 10^{-3}$ M à pH 7,5.

Cette colonne (60 x 3 cm) est lavée par 3 volumes de tampon phosphate 10^{-2} M. Cette première fraction ne contient pas d'activité.

Nous éluons avec du tampon phosphate $1,5 \cdot 10^{-2}$ M une deuxième fraction qui ne présente pas d'activité. On suit l'élution avec un enregistreur "Beckman - Uvicord" indiquant la présence de la protéine dans l'éluat par la mesure de l'absorption à 260 m μ . Quand le deuxième pic est élué on emploie un tampon phosphate $2,5 \cdot 10^{-2}$ M à pH 7,5, le troisième pic obtenu contient toute l'activité.

d) Par gel de phosphate de calcium

Les fractions correspondantes au pic n° 3 sont rassemblées. On ajoute 1 ml de gel de phosphate de calcium par mg de protéine. Ce gel est préparé par la méthode décrite par COLOWICK^(11 bis). Il doit avoir au moins 3 mois d'âge pour donner une bonne séparation.

Après avoir été laissé 1 heure en contact avec la solution protéique, le gel est lavé trois fois par du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 et recueilli par centrifugation de 3 mn à 1.000 g. Il est important de centrifuger à faible champ pour ne pas détruire le gel.

L'enzyme est élué par un tampon phosphate 0,4 M à pH 7,5. On le précipite ensuite dans une solution saturée à 90% en sulfate d'ammonium.

c) Sur Séphadex

Le précipité redissous dans 3 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5 est fractionné sur Séphadex G 100 relié au collecteur de fraction "Beckman" et enregistreur "Uvicord".

On obtient deux pics dont le deuxième seul montre une activité importante. Après précipitation par saturation en sulfate d'ammonium on garde la protéine dans un tampon phosphate 0,01 M à pH 7,5.



Les tests d'activité sont établis par la méthode de HESTRIN⁽²⁹⁾ modifiée par FRIEDMAN^(21 bis).

On incube la solution enzymatique avec 1 μ Mole d'acétyl CoA et 1 μ Mole de carnitine. Après 20 minutes à 35°, on ajoute :

0,1 ml de $\text{NH}_2\text{OH HCl}$ à 28 %
0,5 ml de NaOH à 14 % (3,5 N)
1 ml de HCl à 25 % (3 N)
1 ml de FeCl_3 5 % dans HCl 0,1 N

On fait la lecture au spectrophotomètre à 540 m μ . Les différentes caractéristiques de chacune des étapes sont représentées dans le tableau **XV**.

Des tests en présence de choline, bétaine et γ butyrobétaine ne nous ont montré aucune action transférante. La palmityl carnitine n'est pas hydrolysée en présence de CoA et de l'enzyme. Nous avons constaté l'absence d'acétyl CoA hydrolase.

Des mesures en présence de carnitine D ou de carnitine L ont prouvé que seule la carnitine L est un substrat utilisable.⁽²²⁾ L'organisme n'utilise qu'un inverse optique comme c'est généralement le cas pour les métabolites. Si la carnitine de synthèse est DL la carnitine isolée est L.⁽²⁵⁾

Afin de faire des essais de conservation à 0° nous avons fractionné la solution d'enzyme. La lyophilisation dénature l'enzyme. Après congélation d'un échantillon la solution gardée à 0° a rapidement perdu son activité.

Tableau **XV**

EXTRACTION DU MUSCLE DE PIGEON

Etapes	Volume ml	Unités dans la totalité	Unités /ml	Protéine mg/ml	Activité spécifique
I - Extrait protéique	3 000	—	—	—	—
II - 50 - 62,5 % SO ₄ (NH ₄) ₂	258	—	—	26	—
III - 0 - 32 % acétone	230	1 320	5,7	4,45	1,3
IV - D.E.A.E. cellulose	1 800	430	0,24	0,03	8
V - Gel de phosphate de calcium	120	54	0,45	0,03	15
VI - Séphadex G 100	60	45	0,75	0,02	30
VII - Solution finale	10	45	4,5	0,15	30

Note : Une unité enzymatique correspond au nombre de $\frac{1}{10}$ de micromoles de substrat réagissant par minute. Soit au nombre de $\frac{1}{10}$ de micromoles d'acétyl carnitine formé par minute.

De même nous n'avons gardé qu'une semaine l'échantillon dans le tampon 0,1 M, trois semaines dans le tampon 0,05 M et plus d'un mois dans le tampon 0,01 M (tampon phosphate à pH 7,5).



Ces essais ont limité le nombre de dosages en milieu biologique. La méthode, si elle nous donne une quantité suffisante d'enzyme, est assez longue et assez coûteuse. Il est difficile de se procurer des pigeons suivant les besoins en enzyme. Il en faut un grand nombre puisqu'on ne recueille que 50 à 80 g de muscle par animal.

Possédant une préparation assez pure qui pouvait être utilisée comme référence nous avons essayé d'extraire l'enzyme par une méthode très simple d'un matériau facile à obtenir.

II. - A PARTIR DE COEURS DE PORC OU DE BOEUF

Des cœurs obtenus à l'abattoir municipal sont congelés immédiatement après dépeçage de l'animal et élimination du sang.

Nous avons, dans un but de simplicité et de rapidité, modifié la méthode que FRITZ et coll.⁽²⁴⁾ ont préconisée pour les cœurs de porcs.

1° Extraction protéique

Le cœur dégelé, environ 200 g, est débarrassé de sa graisse puis coupé en fines lamelles. Le muscle est lavé plusieurs fois avec une solution de saccharose 0,25 M contenant $5 \cdot 10^{-3}$ M d'E.D.T.A. à pH 7,5. Des portions

de 50 à 60 g sont ensuite homogénéisées au "Turmix" avec deux parties de la solution de saccharose en veillant à ne pas échauffer le mélange. On centrifuge la suspension obtenue 15 mn à 10.000 g.

Le résidu est repris deux fois à l'Ultra-Turrax avec 200 ml de tampon phosphate 0,1 M à pH 7,5, contenant $5 \cdot 10^{-3}$ M d'E.D.T.A.

On centrifuge à 37.000 g pendant 30 mn, le précipité n'adhère pas au fond du tube. Pour avoir une solution claire on ne récupère que les $\frac{3}{4}$ de la solution de chaque tube.

Comme précédemment, on mesure la concentration en protéine au spectrophotomètre⁽³⁵⁾ à 260 et 280 μ l.

2° Purification

La solution est soumise au relargage par le sulfate d'ammonium.

Un premier précipité obtenu pour une concentration en sulfate d'ammonium de 200 g/l est éliminé. La protéine enzymatique est précipitée par une addition supplémentaire de 400 g/l de sulfate d'ammonium. Après une précipitation d'une nuit, on centrifuge à 18.000 g pendant 1 heure et on décante le surnageant qui est jeté. La protéine est dissoute dans une solution de phosphate bipotassique 0,1 M.

On ajoute 1 mg de gel de phosphate de calcium par mg de protéine. On laisse une heure au froid en agitant toutes les 10 minutes environ.

On centrifuge 3 mn à 1.000 g de façon à ne pas tasser le gel. On lave par 300 ml de K_2HPO_4 0,05 M en remettant le gel en suspension pour obtenir un liquide homogène sans agglomérat. On centrifuge à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment.

On élue ensuite en trois fois par 150, 50 et 50 ml de phosphate de potassium 0,4 M à pH 8. La dernière centrifugation étant plus complète (10 mn à 4.000 g).

On précipite la protéine par le sulfate d'ammonium à 90 % de saturation puis on le redissout dans une solution de K_2HPO_4 0,1 M. On refait une deuxième puis une troisième extraction sur gel de phosphate de calcium comme celle qui a précédé le relargage au sulfate d'ammonium.

Après une nouvelle précipitation par le sulfate d'ammonium à 90 % de saturation, l'enzyme est repris dans une solution de tampon phosphate 0,01 M à pH 6,9 contenant $5 \cdot 10^{-3}$ M d'E.D.T.A.

En suivant ce mode opératoire, nous avons obtenu pour plusieurs extractions, des résultats différents pour l'activité spécifique, mais identiques pour la quantité totale d'enzyme obtenu et surtout pour sa spécificité. Cet enzyme est en particulier dépourvu d'acétyl CoA hydrolase (3-1-21) qui libérerait du CoA en l'absence de carnitine et rendrait le dosage impossible.

Les résultats obtenus pour une extraction sont résumés dans le tableau

XVI.

Notre meilleure extraction nous a donné une activité spécifique finale de 10. N'ayant pas mesuré les activités des différentes étapes nous n'avons pas dressé de tableau comparatif.

Nous obtenons à peu près le même nombre d'unités totales pour 200 g de cœur de porc ou 600 g de muscle de pigeon. Si ce deuxième enzyme est moins pur sa spécificité est comparable. Elle est sans action sur la choline, bétaine, γ butyrobétaine.

Sur des cœurs de bœuf, nous avons, avec le même protocole expérimental, obtenu des activités spécifiques plus faibles. Mais à défaut de porc ce substrat est également utilisable car l'enzyme obtenu est dépourvu d'acétyl CoA hydrolase.

On peut conserver l'enzyme dans du tampon phosphate 0,01 M à pH 6,9 plus de 3 mois à une température juste supérieure au point de congélation c'est à dire entre 0 et 2°.

Tableau **XVI**

EXTRACTION ENZYMATIQUE A PARTIR DU COEUR DE PORC

Opération	Protéine totale mg	Volume ml	Unités dans la totalité	Activité spécifique
Homogénat	8 500	—	—	—
K ₂ H PO ₄	4 250	250	—	—
SO ₄ (NH ₄) ₂	1 000		200	0,2
Elution gel 1	420	200	120	0,5
" gel 2	42	200	63	1,5
" gel 3	18	100	50	2,8
Solution finale	18	10	50	2,8

La rapidité d'extraction (3 jours) nous fait préférer cette méthode malgré une moindre pureté qui ne paraît pas gêner la spécificité.

DOSAGE

1° Extraction de la carnitine

Pour des dosages sur des tissus, afin d'avoir des valeurs utilisables, nous congelons immédiatement l'organe dans l'azote liquide, après son excision de l'animal tué par décapitation.

On place 4 g de tissu frais dans un tube de centrifugeuse, à large col, pour introduire l'axe d'un homogénéiseur "Ultra-Turrax" et assez profond pour éviter les projections. On ajoute environ 4 ml/g d'acide perchlorique à 3% refroidi à 0°. On poursuit le broyage à 0° pendant une minute environ. On centrifuge 10 mn à 5.000 g. Le culot est repris une fois par l'eau distillée. Les surnageants sont réunis, neutralisés par la potasse, et après 30 mn sont centrifugés 20 mn à 10.000 g afin d'obtenir un liquide clair.

La solution est concentrée à quelques millilitres à l'évaporateur rotatif sous vide, filtrée, puis ajustée à 10 ml dans du tampon TRIS 0,1 M à pH 7,7.

Pour oxyder les groupes thiols éventuels on chauffe la solution 5 à 10 mn au bain-marie bouillant.

2° Dosage enzymatique

Afin de minimiser la quantité de réactif, nous utilisons des cuves de 1 ml.

Ces cuves, à double paroi, sont reliées à un ultra-thermostat qui établit une circulation d'eau à $35^{\circ} \pm 0,5$.

Nous mesurons différents "blancs" A à C dont les cuvettes contiennent :

A :	0,1 ml	0,1 μ M de D.T.N.B.
	0,1 ml	de l'extrait à doser
	0,8 ml	de tampon TRIS-HCl pH 7,7
B :	0,1 ml	0,1 μ M de D.T.N.B.
	0,1 ml	de la solution enzymatique
	0,8 ml	de tampon TRIS-HCl pH 7,7
C :	0,1 ml	0,05 μ M d'acétyl CoA
	0,1 ml	0,1 μ M de D.T.N.B.
	0,1 ml	de la solution enzymatique (0,5 unité)
	0,7 ml	de tampon TRIS-HCl pH 7,7

La cuvette test contient :

0,1 ml	0,05 μ M d'acétyl CoA
0,1 ml	0,1 μ M de D.T.N.B.
0,1 ml	de la solution enzymatique (0,5 unité)
0,7 ml	de tampon TRIS-HCl pH 7,7 + aliquote de la solution à doser

L'essai A fait préalablement sur chaque extrait nous permet de nous rendre compte si les groupes thiols dans les tissus sont à trop haute concentration. Dans ce cas on peut essayer de chauffer à nouveau à 90° pendant 5 minutes en portant le pH à 9, puis en ramenant à pH 8 par l'acide chlorhydrique. On porte l'échantillon à 25 ml. On peut aussi diminuer la prise d'essai si la quantité de carnitine le permet. En général la valeur de la densité optique par rapport à l'eau distillée est très faible.

L'essai B nous permet de nous rendre compte si l'enzyme isolé ne libère pas de groupesthiols au cours du temps d'incubation (20 minutes).

Enfin l'essai C tient compte de la libération de groupes thiols par la protéine mais aussi de la présence d'acétyl CoA hydrolase dans l'extrait

enzymatique. Avec les extraits utilisés nous n'avons jamais dépassé une densité optique de 0,12 par rapport à l'essai sans enzyme. La valeur trouvée est retranchée de celle de l'essai de dosage.

On a établi avec le spectrophotomètre "Safas cadet" la courbe d'étalonnage ci-contre à 412 m μ .

L'enzyme est ajouté en dernier. Dès son addition le chronomètre

est mis en marche et, à 30 secondes, on établit le point zéro d'absorption. Ces 30 secondes sont mises à profit pour homogénéiser le contenu de la cuve par retournement.

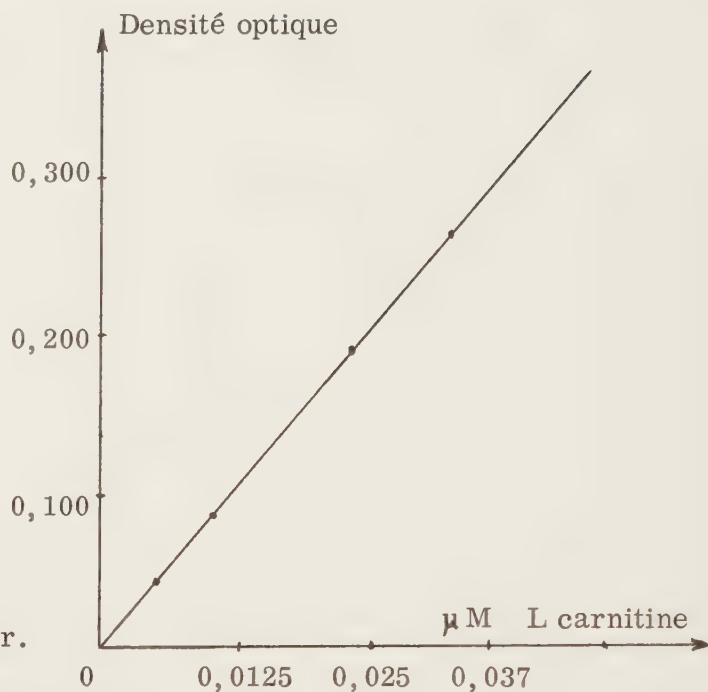
La réaction est terminée quand on atteint le palier de densité optique ce qui nécessite 15 minutes environ.

On a remarqué qu'une incubation préalable de l'enzyme en présence de D.T.N.B. à 35° sans autre substrats, inhibe totalement l'enzyme.

3° Etude de l'hydrolyse du substrat

L'extraction, telle qu'elle est décrite précédemment, nous permet de doser la carnitine libre dans les tissus. L'extrait acido-soluble peut également contenir des formes combinées, essentiellement des esters à courte chaîne, l'acétyl carnitine⁽⁷⁾, la propionyl carnitine⁽⁴⁾ ont été mises en évidence.

Afin de doser la carnitine hydrosoluble totale nous hydrolysons les extraits acido-solubles par la soude 0,3 N :



A 5 ml de solution, on ajoute une pastille de soude, l'échantillon est laissé une demi-heure au bain-marie à 50°. Après neutralisation par l'acide perchlorique N on laisse reposer au moins 30 minutes. On élimine le précipité par centrifugation. Le surnageant est amené à 10 ml et dosé comme précédemment.

Nous avons comparé cette hydrolyse avec une hydrolyse chlorhydrique 6 N à reflux pendant 6 heures. Ayant trouvé les mêmes résultats, et devant la rapidité et la commodité de l'hydrolyse basique, nous avons utilisé systématiquement cette dernière.

Dans le résidu d'extraction nous avons libéré la carnitine combinée appartenant éventuellement à l'insoluble par une hydrolyse sous reflux d'acide chlorhydrique 6 N pendant 6 heures.

Afin de déterminer la durée optima nous avons établi une courbe d'hydrolyse. Nous avons dosé la carnitine libérée en fonction du temps sur du muscle de bœuf (matière sèche 28 %). Il s'agit bien entendu de la carnitine totale du tissu, tableau **XVII**.

Tableau **XVII**

CARNITINE LIBÉRÉE PAR LE MUSCLE DE BOEUF
EN FONCTION DE LA DURÉE D'HYDROLYSE

Temps	0 h 30	1 h	4 h	6 h	8 h	12 h
mg de carnitine par g de matière fraîche	0,232	0,244	0,550	0,650	0,680	0,660
mg de carnitine par g de matière sèche	0,83	0,87	1,96	2,32	2,43	2,36

Nous n'avons pu comparer cette méthode d'hydrolyse avec celle à l'acide nitrique. La réaction de MILLON nous donne un complexe absorbant fortement dans le jaune et rendant impossible le développement de la méthode colorimétrique à 412 m μ .

DOSAGE DE LA CARNITINE DANS LES SUBSTANCES BIOLOGIQUES

1° Dosage dans les produits alimentaires

Afin de vérifier sa facilité d'emploi et sa valeur en chimie alimentaire, nous avons testé cette méthode sur quelques produits de charcuterie. Leurs teneurs en thiols ne sont pas plus élevées que celles de produits frais. Leur teneur en carnitine libre est par contre plus importante : les traitements subis ont suffi pour hydrolyser la presque totalité des différents esters. Comme le montre le tableau **XVIII**, le dosage de carnitine libre nous donne une bonne approximation sur la teneur en carnitine totale des échantillons. Les différences d'un échantillon à l'autre tiennent sans aucun doute à l'abondance variable de la matière grasse surajoutée à la viande.

2° Etude des hydrolyses post-mortem dans le muscle de lapin

Immédiatement après la mort par saignée de l'animal, il se produit dans le muscle une série de phénomènes enzymatiques variés. On passe d'un

Tableau **XVIII**

	Saucisson	Saucisse de Strasbourg	Paté de foie
Matière sèche	80 %	40 %	45 %
Carnitine hydrosoluble libre	1,66	1,09	0,90
Carnitine hydrosoluble totale	1,77	1,09	0,92
Carnitine totale	1,80	1,07	0,95

Valeurs exprimées en mg d'ion carnitine par g de matière sèche

métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie. Une étape de ces transformations est celle par laquelle le muscle mérite d'être qualifié "viande" car la qualité culinaire s'améliore d'abord pour décroître à la longue.

Au niveau de la cellule les réactions post-mortem se traduisent par des remaniements provoqués par les dégradations enzymatiques. On a montré qu'après un séjour de trois semaines au froid l'activité de la plupart des enzymes des tissus musculaires était en effet peu modifiée.⁽⁴⁶⁾

Ces transformations biochimiques complexes peuvent en particulier conduire à des modifications dans la répartition des différentes formes de carnitine.

D'autre part, ne pouvant faire de nombreuses extractions simultanées, il était intéressant de déterminer si une congélation dans l'azote liquide (seule façon de bloquer immédiatement les réactions enzymatiques) ne produisait pas de variations dans la répartition de la carnitine libre et estérifiée.

Les résultats consignés dans le tableau **XIX** nous montrent, d'une part l'importance et la rapidité des transformations enzymatiques, d'autre part l'efficacité du traitement à l'azote liquide.

Ces conclusions nous indiquent :

- 1) qu'il faut disséquer le plus rapidement possible ;
- 2) qu'il faut congeler le tissu immédiatement après son excision ;
- 3) qu'on peut le garder ensuite au congélateur.

Nous avons toutefois remarqué qu'après un long séjour au congélateur (plusieurs semaines) il y a libération de groupements sulfhydryles dans les tissus, et qu'ils ne disparaissent pas après hydrolyse de 10 mn à 90° à pH 8,5 à 9, empêchant, de ce fait, parfois le dosage.

3° Teneur en carnitine de divers tissus

a) Chez le lapin

Le lapin est un animal assez gros pour que le poids de ses organes permette un dosage de carnitine sur un seul animal. Il est assez petit pour être disséqué rapidement.

L'animal assommé est décapité et saigné. Les divers tissus sont prélevés rapidement et congelés immédiatement dans l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite conservés au congélateur à - 30° jusqu'au moment de leur dosage. Ils sont pesés avant décongélation. Les matières sèches ont été calculées après lyophilisation des échantillons à poids constant (24 h environ). Ceux-ci sont traités comme il est décrit plus haut. Le sérum est déféqué par l'acide trichloracétique à 10 %, centrifugé, neutralisé, puis concentré sous vide avant dosage. Chaque extraction a été faite en double, nous donnons le chiffre moyen.

Tableau **XIX**

ÉVOLUTION DES FORMES LIBRES ET COMBINÉES
APRÈS LA MORT DE L'ANIMAL

Temps	0		1/4 h		4 h		24 h		Séjour de 48 h au congélateur
		azote		azote		azote		azote	
Carnitine hydrosoluble libre	0,111	0,108	0,435	0,42	0,42	0,44	0,42	0,50	0,105
Carnitine hydrosoluble totale	0,192	0,200	0,53	0,50	0,55	0,52	0,58	0,60	0,202

Note : Les colonnes marquées azote correspondent aux chiffres obtenus après avoir plongé l'échantillon, juste avant dosage, dans l'azote liquide pendant 2 mn.

On extrait l'acido-soluble quand l'échantillon est juste dégelé.

Nous constatons :

- 1) qu'il y a peu de carnitine non acido-soluble ;
- 2) que la moitié de la carnitine acido-soluble du muscle strié est sous forme libre ;
- 3) que la teneur en carnitine des différents organes est très variée.

b) Comparaison avec la bibliographie

Les résultats bibliographiques sur la carnitine, assez rares, paraissent néanmoins très divers. Pour la carnitine libre les valeurs varient de 0,5 à 1 mg/g sec pour le muscle, de 0,25 à 1,0 pour le cœur, 0,1 à 0,2 pour les reins et le cerveau, 0,1 à 0,4 pour le foie, ces chiffres ayant été obtenus pour des tissus de rat.

Il y a malheureusement peu de chiffres obtenus sur d'autres animaux (voir tableaux **XX - XXI** et **XXII**).

Les variations observées peuvent être dues en partie à la diversité des méthodes employées, plus ou moins spécifiques, et pouvant entraîner des erreurs par excès.

Mais de grandes variations viennent aussi des différences d'âge, de sexe et surtout de régime.⁽⁴⁰⁾ La teneur en carnitine semble en effet être le reflet du métabolisme lipidique. Après des régimes pauvres en choline ou en méthionine la teneur en carnitine diminue.⁽¹²⁾ Des rats acclimatés au froid montrent une augmentation de leur teneur en carnitine.⁽⁴³⁾ Les quantités d'acyl carnitine, à longue chaîne, varient comme celles des acyls CoA c'est à dire augmentent, quand on fournit des acides gras libres par des régimes gras, dans les cas de diabète, de jeûne.⁽⁴⁸⁾

Tableau **XX**

TENEURS EN CARNITINE DE QUELQUES ORGANES DE LAPIN

Tissus	Carnitine hydrosoluble libre	Carnitine hydrosoluble totale	Carnitine totale
Muscle	2,4	4,7	5,1
Cœur	1,9	4,2	4,6
Rein	0,74	0,79	—
Foie	1,44	1,84	1,9
Cerveau	0,72	0,80	—
Diaphragme	5,6	8,0	8,6
Sérum	0,024/ml	—	—
Testicules	2,2	2,8	—
Estomac	3,80	4,2	—

Résultats exprimés en micromoles (μ M) de carnitine
par g de matière sèche.

Tableau **XXI**

VALEURS DE CARNITINE TROUVÉES CHEZ LE RAT

Tissus	Carnitine hydrosoluble libre (38)	Carnitine hydrosoluble libre (40)	Carnitine hydrosoluble totale (40)	Carnitine totale (40)	Divers
	μ M / g frais	μ M / g frais			μ M / g sec
Muscle	3,14	0,442	0,627	—	9,65 ⁽⁴⁵⁾ 3,5 - 7 ⁽³⁹⁾
Cœur	4,87	0,302	0,780	0,830	1,5 - 7,1 ⁽⁴⁵⁾
Rein	1,26	0,310	0,487	0,503	1,24 ⁽⁴⁵⁾
Surrénale	—	0,185	0,262	—	—
Foie	—	0,173	0,296	0,307	—
Cerveau	0,55	0,043	0,050	—	0,01 ⁽³⁹⁾
Diaphragme	—	0,285	0,464	—	—
Testicule	1,74	0,091	0,186	—	0,36 - 0,48 ⁽³⁹⁾
Sérum	0,051/ml	—	—	—	—

Tableau **XXII**

TENEURS EN CARNITINE DE QUELQUES TISSUS CHEZ DIVERS ANIMAUX

Chez le chien : valeurs exprimées en mg / g de matière sèche⁽⁹⁾

	Cerveau	Pancréas	Thymus	Plasma	Muscle
Carnitine hydrosoluble libre	< 0,01	0,017	—	—	—
Carnitine hydrosoluble totale	—	—	—	—	2,3
Carnitine totale	0,35	0,32	0,7	0,0024 / ml	4,1

TENEURS DU MUSCLE : valeurs exprimées en mg / g de matière sèche

Chien ⁽¹⁹⁾	Lapin ⁽¹⁹⁾	Rat ⁽¹⁹⁾	Cheval ⁽²⁰⁾
1,12	0,72	0,56 - 1,12	2,5

TENEURS DU LAIT DE VACHE⁽⁹⁾ en mg par g de matière sèche

Carnitine hydrosoluble libre	0,021
Carnitine hydrosoluble totale	0,021
Carnitine totale	0,032

On remarque chez le cœur de lapin comme pour celui de rat un rapport voisin de l'unité entre la carnitine libre et la carnitine acido-soluble estérifiée. D'autre part, cet organe paraît être le muscle le plus riche en carnitine totale chez les animaux étudiés.⁽⁵⁾

On constate une forte concentration en carnitine dans les surrénales⁽¹⁾ sans doute en relation avec la synthèse des corticoïdes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons recherché une méthode simple de dosage de la carnitine dans les salaisons, afin de contrôler leur teneur en protéines musculaires animales. Nous nous sommes rendu compte de la labilité des différents esters de carnitine, entraînant l'hydrolyse enzymatique dans les tissus après la mort de l'animal et l'hydrolyse chimique lors des méthodes d'extractions et de dosages.

Ces deux phénomènes conjugués avec la possible adsorption lors de la défécation nous ont donné des résultats irréproductibles pour l'étude des différentes formes de carnitine par une méthode chimique. Dans le seul but d'analyse alimentaire, nous pouvions nous en contenter puisque les valeurs de carnitine totale sont par contre reproductibles, mais la méthode de dosage est longue et par conséquent d'emploi très limité.

Dans un but de rapidité et d'universalité nous avons étudié une méthode de dosage enzymatique spécifique. L'extraction de l'enzyme est assez facile et surtout très rapide. Elle peut être menée sans vérifications intermédiaires, à condition d'étudier l'activité et la spécificité de l'enzyme sur la solution finale. L'extraction et le dosage de carnitine libre peuvent être terminés en une heure. Ce court délai limite les hydrolyses surtout si l'on opère à 0°.

Les traitements et la longue maturation qu'ont subi charcuteries et salaisons font qu'il reste peu de carnitine liée dans ces produits, il semble qu'un simple dosage de carnitine libre nous fournisse une approximation suffisante de leur teneur en carnitine.

Nous avons étudié avec plus de précision l'évolution post-mortem des formes de carnitine dans les tissus. Il semble que l'hydrolyse enzymatique des esters soit très rapide. Nous sommes donc obligé, afin d'étudier leur répartition, de congeler les tissus immédiatement après la mort de l'animal. Cette évolution nous montre l'impossibilité de faire des dosages diversifiés sur de gros animaux dont la dissection est longue. La seule indication de valeur que nous puissions obtenir est la répartition de la carnitine totale.

D'après une étude bibliographique, et nos dosages sur les tissus de lapin, il semble que la répartition soit inégale suivant les espèces, rat, chien, lapin, cheval, bœuf. Elle l'est aussi suivant les individus puisque l'influence de leur régime alimentaire a été démontrée. Elle diffère aussi suivant les organes et les tissus : un ml de sérum en contient dix fois moins qu'un gramme de cerveau qui lui-même en contient le dixième d'un gramme de muscle cardiaque. Il est confirmé que la carnitine est un constituant musculaire préférentiel, mais non spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDEL KADER M. et WOLF G. dans "Recent Recherche on Carnitine".
M.I.T. Press (1965), p. 147.
2. BALEUX B., CHUILLON J., GRAFFIN P. et GUASTALLA J. :
C.R. Ac. Sc. Paris, 262, (1966), 1135.
3. BODE C. et KLIGENBERG M. : Biochem. Z., 341, (1965), 271.
4. BØMER T. et BREMER J. : Biochim. Biophys. Acta, 152, (1960), 559.
5. BØMER T., NORUM K.R. et BREMER J. : Biochim. Biophys. Acta
125, (1966), 244.
6. BODWEL C.E., PEARSON A.M. et FENWEL R.A. : J. of Food
Science, 30, (1965), 6.
7. BREMER J. : J. Bio. Chem., 237, (1962), 2228.
8. BREMER J. : J. Bio. Chem., 237, (1962), 3628.
9. BROEKHUYSEN J. et DELTOUR G. : An. Bio. Clin., 7, (1961), 549.
10. CHASE J.F.A., PEARSON D.J. et TUBBS P.K. : Biochim. Biophys.
Acta, 96, (1965), 162.
11. COLOWICK J.P. dans COLOWICK J.P. et KAPLAN N.O. "Methods
in Enzymology" Ac. Press. New-York. Vol. 1, p. 451.
- 11^{bis} COLOWICK J.P. dans COLOWICK J.P. et KAPLAN N.O. "Methods
in Enzymology" Ac. Press. New-York. Vol. 1, p. 98.
12. CORREDOR C., MANSBACH C. et BRESSLER R. : Biochim. Biophys.
Acta, 144, (1967), 360.

13. DELTOUR G., BROEKHUYSEN J. et DIERICKX L. : Clin. Chim. Acta, 5, (1960), 181.
14. DUCET G. et KAHANE E. : Bull. Soc. Chim., 21, (1954), 514.
15. DYER W.J. : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, (1945), 351.
16. ELLMAN G.L. : Arch. Biochem. Biophys., 59, (1955), 491.
17. ENEROTH P. et LINDSTEDT G. : Anal. Biochem., 10, (1965), 479.
18. FRAENKEL G. : Nature, 161, (1948), 181.
19. FRAENKEL G. : Biol. Bull., 104, (1953), 359.
20. FRIEDMAN S. : Arch. Biochem. Biophys., 75, (1958), 24.
21. FRIEDMAN S., Mc FARLANE J.E., BATTACHARYA P.K. et FRAENKEL G. : Arch. Biochem. Biophys., 59, (1955), 484.
- 21^{bis}. FRIEDMAN S. et FRAENKEL G. : Arch. Biochem. Biophys., 59, (1955), 491.
22. FRIEDMAN S. et FRAENKEL G. : Arch. Biochem. Biophys., 82, (1959), 70.
23. FRITZ I.B. et YUE K.T.N. : Physiol., 5, (1962), 144.
24. FRITZ I.B., SCHULTZ J.K. et SRERE P.A. : J. Bio. Chem., 238, (1963), 2509.
25. FRITZ I.B. et YUE K.T.N. : J. Lip. Res., 4, (1965), 279.
26. GULEWITCH W. et KRIMBERG G. : Z. Phys. Chem., 45, (1905), 326.
27. GUGGENHEIM dans "Die Biogenem Amine". Verlag von S. Kargue. Bâle - New-York, 1940.
28. HAGERDON H.C. et JENSEN B.N. : Biochem. Z., 135, (1923), 46.
29. HESTRIN S. : Biochim. Biophys. Acta, 180, (1949), 249.
30. KAHANE E. et LÉVY J. : Bull. Soc. Chim. Biol., 21, (1939), 230.
31. KAHANE E. : J. Pharm. et Chim., 22, (1935), 254.
32. KAHANE E. et DUCET G. : Bull. Soc. Chim. Biol., 28, (1946), 794.
33. KAHANE E. et LÉVY J. dans "Biochimie de la choline et de ses dérivés". Herman éd. Paris, (1938), 50.

34. KUTSHER F. : *Unters. Nahurungs. Gen.*, 10, (1905), 528
11, (1906), 582.
 35. LAYNE E. dans COLOWICK J.P. et KAPLAN N.O. : "Methods
in Enzymology", vol. 2. Acad. Press. N. Y. Vol. 2, p. 447.
 36. LINTZEL W. : *Biochem. Z.*, 273, (1934), 243.
 37. MARANZI A.D. et CARDINI C.E. : *J. Bio. Chem.*, 147, (1943), 363.
 38. MARQUIS N.R. et FRITZ I.B. : *J. Lip. Res.*, 4, (1964), 181.
 39. MEHLMAN M.A. et WOLFF G. : *Arch. Biochem. Biophys.*,
98, (1962), 146.
 40. PEARSON D.J. et TUBBS P.K. : *Nature*, 202, (1964), 91.
 41. PEARSON D.J. et TUBBS P.K. : *Biochem. J.*, 105, (1967), 953.
 42. REES H.G. et SALWAY A.H. : *Chem. Ind.*, 92, (1947), 302.
 43. SIMENAUER A. : Contribution à l'étude de la bétaine de Bêta vulgaris.
Thèse d'Université, 1957, Montpellier.
 44. STRACK E., LORENTZ I. et ROZSCH W. dans "Protides of the
Biological fluids". 7th colloquium Elsevier, (1960), p. 248.
 45. STRACK E., WODEHOFF et SCHWANEBERG H. : *Z. Physiol.*
Chem., 238, (1936), 183.
 46. STILES H.R., PETERSON W.H. et FRED E.B. : *J. Bact.*, 2,
(1926), 427.
 47. TERRIAULT D.G. et MEHLMAN M.A. dans "Recent Research on
carnitine". M.I.T. Press, (1965), 141.
 48. TUBBS P.K. et GARLAND P.J. : *Biochem. J.*, 93, (1964), 550.
 49. WALLS J.S., CHRISTIANSON D.D., DIMLER R.J. et SENTI R.S. :
Anal. Chem., 32, (1960), 870.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	3
Première Partie - ÉTUDE DU DOSAGE DE LA CARNITINE	
PAR DES MÉTHODES CHIMIQUES	5
● Choix d'une technique	5
I. Extraction	5
1° Extraction en milieu acide	5
2° Extraction en milieu neutre	6
II. Caractérisation de la carnitine	7
1° Hydrolyse	7
2° Séparation sur résine cationique	8
III. Dosage	12
1° Dosage comme triméthylamine	12
2° Dosage comme Reineckate	13
3° Dosage comme periodure	14
IV. Conclusion	22
● Application aux milieux biologiques	24
I. Dosage sur un milieu stabilisé	24
II. Dosage sur des homogénats de muscle	25
III. Discussion de la validité de la méthode chimique de dosage	29
1° Extraction	29
2° Isolement	30
3° Dosage	30

Deuxième Partie - ÉTUDE DU DOSAGE DE LA CARNITINE	
PAR UNE MÉTHODE ENZYMATIQUE	33
● Principe	33
● Préparation de l'enzyme	35
I. A partir du muscle de pigeon	35
1° Extrait protéique	35
2° Fractionnements	36
II. A partir de cœurs de porc ou de bœuf	40
1° Extraction protéique	40
2° Purification	41
● Dosage	44
1° Extraction de la carnitine	44
2° Dosage enzymatique	44
3° Etude de l'hydrolyse du substrat	46
● Dosage de la carnitine dans les substances biologiques	48
1° Dosage dans les produits alimentaires	48
2° Etude des hydrolyses post-mortem dans le muscle de lapin	48
3° Teneur en carnitine de divers tissus	50
DISCUSSION ET CONCLUSION	57
BIBLIOGRAPHIE	59

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté.

Vu et permis d'imprimer
Montpellier, le

Le Doyen de la Faculté
des Sciences

POLY - OFFSET

36, Rue de Porto
MONTPELLIER
